

学校编码: 10384  
学号: 21620111152477

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_  
UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

\_\_\_\_\_硕士\_\_\_\_\_学 位 论 文

***Pseudomonas putida* IOFA1 降解甲醛过程中的关键酶及其作用研究**

**Key enzymes and their roles in the formaldehyde-degrading process in *Pseudomonas putida* IOFA1**

余翔

指导教师姓名: 徐洵 院士

曾润颖 研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2014 年 05 月

论文答辩时间: 2014 年 05 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2014 年 05 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室曾润颖研究员)课题(组)的研究成果,获得(“深海微生物酶在环境与食品安全中的应用潜力评价(DY125-15-T-06)”与“深海微生物分离培养与基因资源获取技术研究(2012AA092103)”)课题经费的资助,在(国家海洋局海洋生物遗传资源重点实验室)完成。

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（     ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年   月   日解密，解密后适用上述授权。

（     ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年   月   日

# 目录

目录.....	I
Contents .....	VI
摘 要.....	1
Abstract.....	2
1. 前言.....	4
1.1. 甲醛污染现状及其防治措施的研究 .....	4
1.1.1. 甲醛对人体健康的危害.....	4
1.1.2. 目前治理甲醛空气污染的措施.....	4
1.1.3. 微生物降解甲醛.....	5
1.2. 恶臭假单胞菌简介 .....	5
1.3. 恶臭假单胞菌的研究概况 .....	6
1.3.1. 恶臭假单胞菌降解研究.....	6
1.3.2. 恶臭假单胞菌生产研究.....	7
1.4. 甲醛歧化酶的研究进展 .....	8
1.5. 转录组学的研究 .....	9
1.6. 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术.....	11
1.7. 本文研究的目的及意义 .....	11
2. 材料与方法 .....	12
2.1. 材料 .....	12
2.1.1. 菌株 .....	12
2.1.2. 引物 .....	12
2.1.3. 主要试剂 .....	13
2.1.4. 数据库和分析软件 .....	13
2.1.5. 培养基 .....	14
2.1.6. 常用溶液 .....	14

2. 2.	实验过程 .....	16
2. 2. 1.	实验方法 .....	16
2. 2. 2.	<i>Pseudomonas putida</i> IOFA1 的转录组测序 .....	20
3.	结果与讨论 .....	23
3. 1.	<i>Pseudomonas putida</i> IOFA1 菌株的转录组测序以及分析 .....	23
3. 1. 1.	转录组测序结果 .....	23
3. 1. 2.	差异基因类型分析 .....	26
3. 2.	<i>Pseudomonas putida</i> IOFA1 菌株甲醛降解机制研究 .....	34
3. 2. 1.	通过转录组初步分析 .....	34
3. 2. 2.	实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 研究与分析 .....	34
3. 3.	IOFA1 甲醛降解途径歧化酶纯化 .....	38
3. 3. 1.	样品处理 .....	39
3. 3. 2.	硫酸铵盐析 .....	39
3. 3. 3.	DEAE-sepharose 离子交换层析 .....	39
3. 3. 4.	甲醛歧化酶 (Formaldehyde dismutase) 性质 .....	41
4.	总结与展望 .....	45
附录一:	甲醛歧化酶基因序列及氨基酸序列 .....	54
附录二:	依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶序列及氨基酸序列 .....	55
附录三:	醇脱氢酶序列及开放阅读框氨基酸序列 .....	56
附录四:	甲酸脱氢酶 $\alpha$ 序列及开放阅读框氨基酸序列 .....	57
附录五:	甲酸脱氢酶 $\beta$ 序列及开放阅读框氨基酸序列 .....	59
附录六:	甲酸脱氢酶 $\gamma$ 序列及开放阅读框氨基酸序列 .....	60
附录七:	甲酸转运蛋白序列及开放阅读框氨基酸序列 .....	61
附录八	实验仪器设备列表 .....	62

# Contents

<b>Contents .....</b>	<b>I</b>
<b>Chinese abstract.....</b>	<b>VI</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1. Introduction of formaldehyde pollution .....	4
1.1.1. The effect of formaldehyde on people .....	4
1.1.2. The current measures to prevent formaldehyde pollution.....	错误！未定义书签。
1.1.3. Microbial degradation of formaldehyde .....	5
1.2. The brief introduction of <i>Pseudomonas putida</i> .....	6
1.3. The overview of <i>Pseudomonas putida</i> .....	6
1.3.1. The research of degradation.....	错误！未定义书签。
1.3.2. The research of production .....	8
1.4. The advance of formaldehyde dismutase .....	9
1.5. The transcriptomics .....	9
1.6. The fluorogenic quantitative PCR .....	11
1.7. Aim and significant of this study .....	11
<b>2. Material and methods.....</b>	<b>12</b>
2.1. Material .....	12
2.2. Methods .....	16
2.2.1. Routine methods.....	16
2.2.2. The transcriptome sequencing of <i>Pseudomonas putida</i> IOFA1 .....	20
<b>3. Results and analysis .....</b>	<b>错误！未定义书签。</b>
3.1. The result of transcriptome sequencing .....	错误！未定义书签。5
3.2. The mechanism of formaldehyde degradation mechanism ....	34
	38
<b>4. Discussion and perspectives .....</b>	<b>45</b>
<b>References .....</b>	<b>50</b>

**Appendix I: sequence of DNA and amino acids of formaldehyde**

<b>dismutase .....</b>	<b>54</b>
<b>Appendix II : sequence of DNA and amino acids of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase .....</b>	<b>55</b>
<b>Appendix III : sequence of DNA and amino acids of alcohol dehydrogenase.....</b>	<b>56</b>
<b>Appendix IV : sequence of DNA and amino acids of formate dehydrogenase <math>\alpha</math> .....</b>	<b>57</b>
<b>Appendix V : sequence of DNA and amino acids of formate dehydrogenase <math>\beta</math> .....</b>	<b>59</b>
<b>Appendix VI : sequence of DNA and amino acids of formate dehydrogenase <math>\gamma</math> .....</b>	<b>60</b>
<b>Appendix VII: sequence of DNA and amino acids of formate/nitrate transporter .....</b>	<b>61</b>
<b>Appendix VIII: Instruments and equipment .....</b>	<b>62</b>

## 摘 要

*Pseudomonas putida* 具有复杂的降解有机物代谢系统，因此经常做为模式菌应用于污水和废物的降解研究中。迄今为止，*Pseudomonas putida* 已被发现可降解很多有毒化合物，但相关降解代谢机理的研究较少。我们以从深海沉积物中筛选到的高效甲醛降解菌 *Pseudomonas putida* IOFA1 为对象，选取该菌株降解甲醛过程中的 3 个时间点，即 A 组（未加入甲醛），B 组（加入甲醛 20min）和 C 组（甲醛降解后 2 h）进行转录组测序，通过转录组变化的比较来探索该菌的甲醛代谢机制。通过生物信息学分析以及对变化基因的分类，我们发现在甲醛的刺激下 *Pseudomonas putida* IOFA1 细胞前后调整了代谢网络。通过 GO (Gene Ontology) 和 KEGG 分析，从整体水平阐述了转录组的变化。通过不同基因的分类研究了甲醛刺激下不同基因的作用以及机制，包括信号分子类，生物调节类，定位类以及其他代谢途径的基因。此外，我们还就在转录组中发现的几个与甲基代谢相关的关键酶开展了研究，为阐明降解机制提供证据。

通过对 *Pseudomonas putida* IOFA1 降解甲醛过程中 3 组样本的转录组分析以及相关基因的 RT-PCR 分析，我们发现 *Pseudomonas putida* IOFA1 中降解甲醛的主要酶包括甲醛歧化酶，依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶，醇脱氢酶，甲酸脱氢酶，甲酸转运蛋白等。甲醛歧化酶 (Formaldehyde Dismutase, FDM) 在降解甲醛的开始阶段起到非常重要的角色，它能快速降解甲醛浓度，保护细菌不受毒害。醇脱氢酶，以及依赖谷胱甘肽的甲醛脱氢酶是配合歧化酶彻底降解甲醛所必须的酶。而其他酶是与甲酸的降解相关。

我们对该菌的细胞破碎液中的酶进行了纯化，得到一条具有甲醛降解活性的单一条带。经质谱鉴定，该蛋白为甲醛歧化酶。酶学性质研究表明该酶最适作用温度为 40℃，最适作用 pH 为 7.5，在低于 30℃ 时酶活十分稳定。低浓度 0.5mM 的  $Mg^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  对酶有促进作用。这些研究为我们进一步开发 *Pseudomonas putida* IOFA1 在降解甲醛方面的用途奠定了基础。

关键词：甲醛降解；转录组；甲醛歧化酶



## Abstract

*Pseudomonas putida* is often used as a model bacterium to study the degradation of sewage and waste because of its complex metabolic system for the degrading of organic waste. The functions of *Pseudomonas putida* for degradation of many toxic compounds have been widely studied, but few of them focus on the metabolic mechanism during these degradation process. The strain *Pseudomonas putida* IOFA1 showing high formaldehyde-degradation ability was isolated and identified from deep sea sediment in our previous study. In this study, the formaldehyde-degradation mechanism in *Pseudomonas putida* IOFA1 was analyzed by comparing the changes in transcriptome of the formaldehyde-degradation process with different time quantum. We selected three samples in different time quantum during formaldehyde degradation (group A: not added formaldehyde; Group B: 20 minutes incubation after added formaldehyde; group C: 2 hours incubation after added formaldehyde). The metabolic network of IOFA1 strain changed obviously under the stimulation of formaldehyde by bioinformatic analysis and the classification of different expression gene. Furthermore, the transcriptional changes was discussed at overall level by GO (Gene Ontology) and KEGG classification analysis. The changed genes related to signal, biology, location and other metabolic pathways were studied by genes classification. In this thesis, several key enzymes related to the methyl metabolisms that was found in transcriptome were studied to support the illumination of the formaldehyde-degradation mechanism in *Pseudomonas putida* IOFA1.

The main enzymes involved in the formaldehyde-degradation in *Pseudomonas putida* IOFA1 were determined by combining the transcriptome analysis and RT-PCR analysis, including formaldehyde dismutase, depend-glutathione formaldehyde dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, formate dehydrogenase and formate transporter. Among these enzymes, formaldehyde dismutase (FDM) play an important role in the early stages of formaldehyde-degradation, and it can degrade formaldehyde rapidly into methanol and formate. Alcohol dehydrogenase and

glutathione-depend formaldehyde dehydrogenase are necessary to fully degradation of formaldehyde. Other enzymes are related to the degradation of formic acid.

The crude enzymes in cell lysate were purified by DEAD-sepharose ion exchange chromatography. One single band was obtained and identified as FDM by mass spectrum analysis. The enzyme had optimal temperature and pH at 40°C and 7.5, respectively, and was stable at temperature under 30°C. Low concentration of  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  activated the enzymatic activity. All of these studies lay a foundation for the application of *Pseudomonas putida* IOFA1 in the degradation of formaldehyde pollution.

Key words: formaldehyde degradation; transcriptome; formaldehyde dismutase

## 1. 前言

### 1.1. 甲醛污染现状及其防治措施的研究

#### 1.1.1. 甲醛对人体健康的危害

甲醛是一种无色具有刺激性气味的气体，广泛用于工业、农业中的有机化合物。它不仅作为一些工业产品的辅助成分之一，在农业医学上经常用于杀菌防腐保鲜。日常生活中，一些工业废气、汽车尾气、垃圾焚烧是室外甲醛的主要来源，但是浓度较低，对人影响小于室内甲醛。目前甲醛污染比较关注的是室内甲醛污染，这里的室内不仅仅是指居住的室内，也包括汽车这种人们常常接触的密闭空间等，而室内甲醛主要来源于含有甲醛的室内装修产品以及一些皮制品物件，例如胶合板，刨花板等人造木材，人造皮革以及粘合剂或者含有甲醛的涂料等等。除此之外，由于一些不符合国家生产标准的材料流入家居装修市场，从而造成了室内甲醛污染。我国规定，室内甲醛含量不超过  $0.08\text{mg}/\text{m}^3$  或  $0.06\text{ppm}$ (GB/T16127-1995居室空气中甲醛的卫生标准)。甲醛在室内浓度大于  $0.08\text{mg}/\text{m}^3$  的甲醛浓度可引起眼红、眼痒、咽喉不适或疼痛、声音嘶哑、喷嚏、胸闷、气喘、皮炎等<sup>[1-6]</sup>。出了上述急性反应之外，甲醛的致癌致畸作用也是威胁着人们的生存。早在1980年，通过大鼠的吸入实验，甲醛被证明是的致癌物<sup>[7-9]</sup>。随后，甲醛的致癌性又得到进一步研究，最多的就是关于白血病方面<sup>[10-12]</sup>。而且，甲醛还具有生殖毒性，尤其是针对男性<sup>[13]</sup>。由于甲醛具有高反应性，能和蛋白质以及核酸发生反应，例如DNA甲基化，造成异常基因表达<sup>[14]</sup>，这可能可以解释甲醛致癌的原因之一。

#### 1.1.2. 目前治理甲醛空气污染的措施

##### 1.1.2.1. 物理方法

物理方法是指利用某些有吸附能力的多孔固体材料，将甲醛以及其他空气污染物吸附在表面以达到祛除污染的目的。物理方法是最简便，最易操作的方法，

材料简单,例如市场上常见的竹炭吸附剂,以及其他材料比如沸石、多空粘土矿石、硅胶等<sup>[15]</sup>。吸附材料的吸附能力和其比表面积有关系,由于比表面积小造成吸附速率慢是目前吸附法技术应用中的受限因素。利用活性炭作为吸附材料成本低,无副作用,但是一旦吸附饱和就不再有吸附作用了,虽然有研究对其进行了改良,并且提高了一定的吸附能力,但是受温度以及饱和影响,可能会再次释放出甲醛,没有根本上消除甲醛以及有害物质<sup>[16,17]</sup>。

### 1.1.2.2. 化学光催化氧化法<sup>[5,18-30]</sup>

TiO<sub>2</sub>是具有光敏导电性的N型半导体。TiO<sub>2</sub>受到波长<387.5nm的紫外光照射时,价带上的电子跃迁到导带上,形成空穴和光激电子,与空气中的水蒸气和氧气作用形成自由基 $\cdot\text{O}$ 和 $\cdot\text{OH}$ ,这种自由基具有高活性地氧化和表面吸附能力,从而将甲醛降解为CO<sub>2</sub>和H<sub>2</sub>O等无机小分子物质。虽然可见光也可以催化二氧化钛,但是比起紫外光能量低,效率低。虽然光催化是无污染,且安全的方法,但是其催化效率有限,无法迅速降解甲醛。

### 1.1.3. 微生物降解甲醛

微生物生物方法主要利用能降解甲醛的微生物,或者它们的酶制剂来降解甲醛。条件温和,成本低,而且能在短时间内降解甲醛。能够降解甲醛的菌很多都具有甲基代谢途径,它们能够利用CO<sub>2</sub>的各种还原态一碳化合物(C<sub>1</sub>),如甲烷、甲醇、甲胺作为碳源和能源生长。一些甲基营养菌的甲醛代谢途径十分错综复杂,同化和异化途径结合在一起<sup>[31-34]</sup>。除此之外,很多微生物都是来源于生活并且广泛纯在,这样就不会破坏环境中微生物平衡。目前,人们已经筛选出许多具有降解甲醛能力的微生物胃分枝杆菌(*Mycobacterium gastri*),红球菌(*Rhodococcus* sp),假单胞菌(*Pseudomonas* sp),醋酸菌(*Acetobacter* sp),拟青霉(*Paecilomyces* sp,曲霉(*Aspergillus* sp.)和木霉(*Trichoderma* sp.)等等<sup>[35-40]</sup>。

## 1.2. 恶臭假单胞菌简介

恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)是需氧型革兰阴性杆菌,有些菌株为卵圆形,单端丛毛菌,在有的情况下,它能以硝酸盐代替电子受体进行厌氧呼吸,

化能异养。它是世界上第一个有专利的有机体。它具有非常强大的降解能力，而这种能力已经运用在污水处理，以及生物修复中。恶臭假单胞菌为鱼的一种致病菌，常从腐败的鱼中检出。但是它又作为人类咽部的正常菌群，是人类少见的条件致病菌。所以作为运用菌，是相对安全的。

### 1.3. 恶臭假单胞菌的研究概况

#### 1.3.1. 恶臭假单胞菌降解研究

恶臭假单胞菌具有强大以及复杂的代谢网络，常常作为一个降解有毒物质的模式菌，其中有毒物质包括苯、甲苯等芳香烃、酚类、喹啉、醛类、菊酯类农药<sup>[41]</sup>等。但是对恶臭假单胞菌在实际工程中的应用，要考虑到最适合温度，pH，溶氧以及有毒物质种类对菌生长的影响。虽然恶臭假单胞菌的降解能力很强大，但是实际生活中的污水成分复杂，仍然有一些物质可能对细菌产生影响，有些物质，例如邻苯二酚的积累对恶臭假单胞菌降解苯的抑制作用<sup>[42]</sup>。而且对于恶臭假单胞菌这样的降解多元有毒污染物质的菌，不同的污染物降解有先后，有的可能降解不完全。污水在污水反应器和菌的反应时间也是需要考虑的。Martin, M.M 等人阐述了恶臭假单胞菌在甲酸，香草醛，苯酚，草酸混合液的生物降解动力学<sup>[43]</sup>。研究了发酵最适温度，pH，溶氧以及反应器的反应时间。在最适合条件下 30℃，pH7，30 h 就可以将总 DOC150ppm 的人工污水降解。在 35℃下，需要 70 h 才能降解完。但是一般城市的污水处理时间都没办法打到 30 h，仍有一些物质没有降解彻底。为了加快恶臭假单胞菌对污水的处理能力。

Al-Zuhair 利用聚乙烯醇（PVA）固定恶臭假单胞菌，通过两种固定技术和两种生物反应器来证明能够有效进行生物降解苯酚<sup>[44]</sup>。此外，在 Xiaoshuang Ma 等人的研究中，他们把恶臭假单胞菌固定在活性炭纤维上面。固定化的恶臭假单胞菌的工作环境为 30℃，pH7.0。由于活性炭的吸附作用，在短时间内，污水中的苯酚浓度从开始的 10000mg/L 下降到 2000mg/L。然后，在接下来的阶段开始生物降解，在释放的协同作用下完成整个过程<sup>[45]</sup>。也就是说一开始活性炭吸附了一部分有毒物质，而后慢慢释放给细菌进行降解。如果在实际污水处理中可以大大降低污水处理时间，可以分流处理。高浓度的污水经过固定化的恶臭假单胞处理器，流出水再连入下一个固定化污水处理器，能在短时间内降低有毒物质含

量,又能给菌有足够的降解时间。而且固定化的细菌容易回收处理,对后续处理也方便。

尹艳娥等人结合了前面两种方法,以活性炭纤维为载体,以聚乙烯醇(PVA)为包埋剂制成固定化恶臭假单胞菌,对含酚废水的降解效果进行研究<sup>[46]</sup>。他们制作出了含有活性炭纤维的聚乙烯醇小球,不仅表现出良好运行周期,菌体问题,在大于 200mg/L 苯酚时候,包埋颗粒表现出很好的耐受和降解能力。

强化生物除磷(EBPR)技术被广泛用于污水除磷中,但是微生物和分子机制知道很少。因此,在大规模城市污水处理厂的生物除磷过程难以预测和控制。CAI Tian-Ming 等人分离出一株拥有高磷降解能力的恶臭假单胞菌 GM6。他们利用基因标记 GM6,来观察 GM6 被送进一个低效率分批式反应器 SBR 中的繁殖以及磷的去除率。在 21 天后,GM6 在总菌中的比例达到 9.2%,磷的去除率达到 96%,相当于浓度 0.2mg/L。在加入了 GMTR 得反应器中,磷在无氧条件下 1 h 内被迅速清除,在有氧条件下 2 h。这些是 GM6 的除磷特点。在医院污水处理设备进行实际测试。在加入 GM21 天后,磷浓度在 0.3mg/L,相当于去除效率 96.8%。因此,GM6 能快速和增强废水中生物除磷的能力,从而实现快速高效净化富磷污水<sup>[47]</sup>。

梁 慧等人利用石英砂、活性炭和火山岩滤料 3 种载体固定恶臭假单胞菌,对污水中的铜离子吸附进行研究,发现均有良好效果,其中孔径为 2~4mm 的火山岩滤料固定化重组菌去除铜离子的效果最好<sup>[48]</sup>。在除去金属另一方面,Valls 等人,表达了一个具有小鼠金属硫蛋白蛋白和奈瑟斯球菌 IgA B 结构域杂合蛋白在菌外膜上。这些细胞的金属结合能力上升了 3 倍<sup>[49]</sup>。如果固定化和基因结合改造用于金属离子的吸收,相信会有更大的效率。

另外,在污水净化中微生物代谢弹性是一个重要的参数。对于微生物代谢弹性,Nigam 等人对恶臭假单胞菌水解芳香烃代谢能力和适应性进行了评估和研究。其发现菌在 1 min 内改变碳负荷来适应不同底物,表面了恶臭假单胞菌有强大的代谢弹性<sup>[50]</sup>。因此作为污水处理工程菌是很有优势的。

### 1.3.2. 恶臭假单胞菌生产研究

恶臭假单胞菌不仅可以作为降解有毒害物质的工程菌,由于其具有复杂多样

的代谢网络以及酶，目前也有研究指出其可能可以作为一种工业原料生产菌。Suzanne Verhoef 等人利用葡萄糖或者甘油并选取拥有最佳流向 L-酪氨酸碳流的菌株，使菌本身的对羟基苯甲酸羟化酶（p-Hydroxybenzoate hydroxylase）失活，防止羟基苯甲酸被降解。他们生产的对羟基苯甲酸（p-hydroxybenzoate）最高浓度达到 11%通过中间代谢产物 L-络氨酸生产对羟基苯甲酸（p-hydroxybenzoate）<sup>[51]</sup>。Kirsten 等人发现一株新恶臭假单胞菌，其具有高的 5-取代的乙内酰脲（5-substituted hydantoins）活性。通过转化 5-烷基乙内酰脲（5-alkylhydantoins）产生 L-氨基酸的产品，包括丙氨酸，缬氨酸，正亮氨酸，生物转化产率 60%之间和 100%<sup>[52]</sup>。Lei Cai, Mei-Qing Yuan 等人敲除了 PHA 解聚酶，是 PHA 产量达到细胞干重 86%，颗粒更大<sup>[53]</sup>。袁 静等人刷选出了一株恶臭假单胞菌 GNA5 来转化 D-氨基葡萄糖(D-glucosamine, D-GlcN)来生产 D-氨基葡萄糖酸(D-Glucosaminic Acid, D-GlcNA)。因该菌对底物 D-氨基葡萄糖的抑菌不敏感，且对产物的降解能力弱，可以大量积累 D-氨基葡萄糖酸<sup>[54]</sup>。除此之外，也有相关资料关于利用恶臭假单胞菌的酶来生产有用物质，例如海藻糖。徐汝意等人筛选出一株恶臭假单胞菌 p06-2 利用该菌株的海藻糖合酶可以将麦芽糖一步转化为海藻糖，而且该酶有极强的底物特异性、只能单一催化麦芽糖<sup>[55]</sup>。由于海藻糖是胞内酶，他们利用甲苯处理细菌，使其成为透性化细胞。透性化细胞制备解决了酶纯化的高成本，酶活损失失活等一些列问题。作者也指出如果结合上固定化细胞技术，可以解决生产上的回收、分离等问题。陈晓云等人也利用透性化恶臭假单胞菌来转化 DL-2-氨基- $\Delta$ 2-噻唑啉-4-羧酸（DL-ATC）为 L-半胱氨酸<sup>[56]</sup>。

#### 1.4. 甲醛歧化酶的研究进展

甲醛歧化酶（Formaldehyde dismutase, FDM）催化醛的歧化作用，包括甲醛，使两摩尔量的甲醛生成一摩尔量的甲酸和一摩尔量的甲醇。甲醛歧化酶的首选底物是水合程度很大的醛类，例如甲醛乙醛和丙酮醛。通过与水合醛类的横向歧化，一些非水合的醛类也可以被降解。因此歧化和横向歧化反应可以看做是与醛醇的氧化还原反应耦合的<sup>[57]</sup>。

从恶臭假单胞菌中得到的歧化酶由4个亚基组成，每个亚基分子量为44000。每个亚基包含1摩尔 NAD(H)和2摩尔/锌摩尔。NAD（H）牢固的结合在各个亚基

上面，但是不是共价键结合。通过额外添加 NADH 不会促进酶的活性，所以该酶不需要添加辅酶，可以直接用于降解甲醛<sup>[58]</sup>。

## 1.5. 转录组学的研究

目前生物学领域，对系统生物学的研究越来越成为热点。系统生物学是研究生物系统组成成分的构成与相互关系的结构、动态与发生，以系统论和实验、计算方法整合研究为特征的生物学。而从中又产生了重要的基因组学、蛋白质组学、转录组学。基因组学是研究生物基因组和运用基因，包括基因作图、测序和整个基因组功能。基因组研究应该包括两方面的内容：以全基因组测序为目标的结构基因组学（structural genomics）和以基因功能鉴定为目标的功能基因组学（functional genomics）。蛋白质组学（Proteomics）是指特定细胞基因组所表达的所有蛋白质。蛋白质组本质上指的是在大规模水平上研究蛋白质的特征，包括蛋白质的表达水平，翻译后的修饰，蛋白与蛋白相互作用等，由此通过蛋白质的变化来获得与细胞代谢，死亡，疾病的发生，个体的发育，癌症的产生等有关的信息，这个概念是1955年，由 Marc Wilkins 提出的。转录组概念于1997年由 Velculescu 等首次提出，酿酒酵母细胞转录组得以全面描述。随后，拟南芥、水稻以及人类常染色体转录组全面分析（转录组测序技术在整合网络调控中的应用现状及前景）。广义的转录组是指在生物细胞在特定条件下转录出的 RNA 总和。这里的 RNA 包括所有的编码蛋白质的 RNA 和非编码蛋白质的 RNA（例如 rRNA，tRNA 等）狭义转录组是指所有的 mRNA 的表达情况。转录组能反应特定时间和空间基因组的表达情况，而基因组只是对基因存在的单方面研究分析。基因组转录组、蛋白质组有关系，但是并不是成完全对应关系。基因组是生物细胞所拥有的基因，而转录组是细胞特定时间基因的表达，蛋白质是 mRNA 翻译的产物，只是转录组的一部分，但是蛋白质组学没办法完全反应基因表达上调下降，尤其当表达倍数不高的情况（转录组蛋白质差异）。转录组对现代生物有着不可取代的地位，它能反应细胞分化的基因表达情况，生物发育的影响基因，细胞对外界应激反应以及细胞癌变的基因表达情况等等，是基因结构和功能研究的一个新的方向。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库